

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

NBIOAS14

2017

Henna Sipilä & Senni Viheriäkoski

OPPIMATERIAALI PUNKTIONESTEIDEN BAKTEERILÖYDÖKSISTÄ



Henna Sipilä & Senni Viheriäkoski

OPPIMATERIAALI PUNKTIONESTEIDEN BAKTEERILÖYDÖKSISTÄ

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli valmistaa sähköinen oppimateriaali punktionesteiden bakteerilöydöksistä. Oppimateriaali toteutettiin power point –muodossa. Tuotoksessa kerrotaan yleisesti punktionesteistä ja niiden gramvärjäyksestä. Bakteerien tunnistus on havainnollistettu kuvin. Työn tilasi Turun ammattikorkeakoulu. Oppimateriaalin tavoite on toimia Turun ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutuksen mikrobiologian opetuksessa ja tukea oppilaita bakteerien tunnistuksessa.

Punktionesteiksi luokitellaan nesteet, jotka sijaitsevat elimistön onkaloissa ja joiden näytteenotto vaatii kehon pinnan läpäisevän toimenpiteen eli punktion. Punktionesteitä ovat pleuraneste, askitesneste, likvor, nivelneste ja luuydin. Terveellä ihmisellä punktionesteissä ei ole bakteereja, mutta niitä voi esiintyä joidenkin tulehdustilojen yhteydessä. Bakteerit voidaan havaita värjäämällä punktioneste gramvärjäysmenetelmällä.

Bakteerit ovat yksisoluisia, esitumallisia eliöitä, joiden tutkimiseen käytetään mikroskooppia. Bakteerit jaotellaan niiden soluseinämän rakenteen mukaan joko grampositiivisiksi tai gramnegatiivisiksi bakteereiksi. Soluseinämä määrittelee myös bakteerisolujen muodon, joka voi olla sauvamainen, pallomainen, nauhamainen tai korkkiruuvimainen.

Gramvärjäys on yksi tärkeimmistä vaiheista bakteerin tunnistuksessa. Grampositiiviset bakteerit värjäytyvät sinivioleteiksi kristallivioletin vaikutuksesta, ja gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät punaisiksi safraniiniliuoksen vaikutuksesta.

Oppimateriaaliin otettiin mukaan vain oleellisin tieto pitäen oppimateriaali selkeänä ja helppolukuisena kokonaisuutena. Teoriatieto on esitetty johdonmukaisessa järjestyksessä sisältäen oikeista potilasnäytteistä otettuja kuvia bakteerilöydöksistä.

ASIASANAT:

Punktionesteet, bakteerit, gramvärjäys, oppimateriaali

Henna Sipilä & Senni Viheriäkoski

LEARNING MATERIAL OF BACTERIAL FINDINGS IN PUNCTURE FLUIDS

The purpose of this thesis was to produce an electronic learning material of bacterial findings in puncture fluids. The learning material was made as power point form. The output includes information about puncture fluids and gram staining. Bacterial identification is illustrated by pictures. The thesis was ordered by Turku university of applied sciences. The aim of this thesis was to help in the studies of biomedical laboratory sciences program of Turku university of applied sciences and support students in bacterial identification.

Fluids located in the body cavities and which sampling requires penetration of the body surface are classified as puncture fluids. Puncture fluids are pleural-, ascites-, cerebrospinal-, synovial-, and bone marrow fluid. There should not be any bacteria in healthy persons puncture fluids, but they may occur in some inflammations. Bacteria can be shown by gram staining.

Bacteria are monolayers, pre-organophilic organisms that are examined by microscope. Bacteria are classified by their structure of cell wall either grampositive or gramnegative bacteria. The cell wall also determines the shape of the bacterium. Different shapes are bacillus, coccus, filamentous and corkscrew's form.

Gram staining is one of the most important step in bacterial identification. Grampositive bacteria gets their blue-violet colour from crystal violet iodine reagent and gramnegative bacteria stains red by the effect of safranin solution.

PowerPoint presentation of puncture fluids includes only the essential knowledge keeping the learning material clear and easy-to-read. The theory of knowledge is presented in a consistent order. Presentation includes pictures of bacteria from real patient samples.

KEYWORDS:

Puncture fluids, bacterial, gram staining, learning material

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	5
2 PUNKTIONESTE	6
2.1 Pleuraneste	6
2.2 Likvor	7
2.3 Askites	7
2.4 Nivelneste	8
2.5 Luuydinneste	9
3 BAKTEERIT	10
3.1 Bakterin rakenne	10
3.2 Gramvärjäys	11
3.2.1 Värjäyksen periaate	11
3.2.2 Värjäyksen suoritus	12
3.2.3 Värjäyksen virhelähteet	13
4 OPPIMATERIAALI	14
5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE	15
6 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	16
6.1 Opinnäytetyön toteutus	16
6.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	16
6.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	17
7 POHDINTA	18
LÄHTEET	20

1 JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön aiheena on elimistön punktionesteet ja niiden yleisimmät bakteerilöydökset. Punktionesteiksi luokitellaan nesteet, jotka sijaitsevat elimistön onkaloissa ja joiden näytteenotto vaatii kehon pinnan läpäisevän toimenpiteen eli punktion (Mundt & Shanahan 2011). Punktionesteiksi luokitellaan pleuraneste, askitesneste, likvor, nivelneste ja luuydin (Tuokko ym. 2008). Terveellä ihmisellä punktionesteessä ei ole bakteereja, mutta niitä voi kuitenkin esiintyä punktionesteissä esimerkiksi joidenkin tulehdustilojen yhteydessä. Ne voidaan havaita värjäämällä punktioneste gramvärjäysmenetelmällä, joka ilmentää bakteerin muotoa ja soluseinämää. (Puhakka ja Salkinoja-Salonen ym. 2002.)

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on valmistaa sähköinen oppimateriaali punktionesteiden bakteerilöydöksistä. Tämän opinnäytetyön tavoite on tukea Turun ammattikorkeakoulun bioanalytikkokoulutuksen mikrobiologian opintojakson opetusta.

2 PUNKTIONESTE

Punktionesteet sijaitsevat ihmisen ruumiinonteloissa ja ne nimetään niiden sijainnin mukaan. Punktionesteitä ovat aivo-selkäydinneste eli likvor, vatsaonteloneste eli askites-neste, keuhkopussinneste eli pleuraneste, nivelneste ja luuydin. (Tuokko ym. 2008.)

Kehon nesteet jaetaan solunsisäiseen nesteeseen (intraseellulaarinen) sekä solun ulkoi- seen nesteeseen (ekstrasellulaarinen). Solun ulkoinen neste jaetaan vielä soluvälines- teeseen (interstitiaalinen neste) ja plasmaan. Kehon onteloissa olevia nesteitä kutsutaan transsellulaarisiksi nesteiksi. Punktionesteistä nivelneste, keuhkoneste ja vatsaontelo- neste lasketaan interstitiaalisiksi nesteiksi ja aivoselkäydinneste sekä luuydinneste transsellulaarisiksi nesteiksi. (Alahuhta ym. 2016.)

Punktioimalla otettava näyte otetaan steriilisti kehon onteloista noudattamalla ehdotonta aseptiikkaa. Bakteeriviljelyssä tutkitaan sekä aerobisesti että anaerobisesti kasvavat bakteerit. Bakteerivärjäystä varten näytettä voidaan laittaa aluslasille näytteenoton yh- teydessä. Värjäystä varten ruiskusta tai näyteputkesta tiputetaan aluslasille tippa näy- tettä, jota levitetään noin 1-2 neliösenttimetrin kokoiselle alueelle. Näytteen kuivuttua lasi värjätään. (Heikkilä ym. 2005.)

2.1 Pleuraneste

Keuhkojen ulkopintaa sekä rintakehän sisäpintaa peittää kalvo, joiden väliin jäävä tila muodostaa keuhkopussin, joka sisältää normaalisti vähäisen määrän nestettä. (Salomaa 2016). Ihmisellä on pleuraontelossa normaalisti noin 0,3 ml pleuranestettä henkilön pai- nokiloa kohden. Pleuranesteen tärkein tehtävä on estää hengityksen aikana viske- laaripleuran peittämän keuhkon seinämän sekä parientaalipleuran peittämän rintakehän seinämän liukuminen kitkatta toisiaan vasten. Pleuraneste muodostuu parientaa- ripleuran kapillaareista tihkumalla keuhko-onteloon ja poistuu imuteitä pitkin imusolmuk- keisiin. Pleuraneste on normaalisti kirkasta ja sisältää noin 15 g/l proteiinia. Neste sisäl- tää keskimäärin 1 500 solua/ μ l, jotka ovat lähinnä mesoteelisoluja sekä valkosoluja. (Kin- nula ym. 2005.)

Pleurapunktio tehdään kun halutaan selvittää keuhkopussin nestekertymän syytä tai hoi- tavana toimenpiteenä nesteen tyhjentämiseksi keuhkopussista. Keuhkokuumeen eli

pneumonian tavallisin aiheuttaja on *Streptococcus pneumoniae*. Tulehdus voi esiintyä yksittäisessä keuhkon osassa tai koko keuhkon kudoksessa. Se esiintyy usein jonkin muun taudin jälkitautina. Muita pneumonian bakteeriperäisiä aiheuttajia ovat *Haemophilus influenzae* ja *Staphylococcus aureus*. (Heikkilä ym. 2005.) Nesteenkertyminen keuhkoihin voi johtua myös sydämen- tai munuaisten vajaatoiminnasta, maksakirroosista tai kilpirauhasen vajaatoiminnasta. (Salomaa 2016.) Pleuranesteestä tehtävän bakteeriväryksen tutkimuslyhenne on Pf-BaktVr ja sitä käytetään diagnostisesti nopeana bakteerien osoittamisena pleuranesteestä. (Tykslab 2017.)

2.2 Likvor

Aivo-selkäydinnesteen tehtävä on suojata hermokudoksia sekä olla osana aivojen ja selkäytimen aineenvaihduntaa. Likvoria muodostuu suodoksena plasmasta ja sitä on ihmisellä keskimäärin noin 100-150 millilitraa. Likvori on normaalisti kirkasta sekä väritöntä nestettä, joka ympäröi aivoja sekä selkäydintä. Syvällä aivojen sisällä on ontelo, jossa on useita kammioita, jotka sisältävät aivoselkäydinnestettä. Kammioita rajaa nestettä tuottava kalvo. Ontelo yhdistyy aivojen sekä selkäytimen ja niitä ympäröivän luurakenteen välisiin alueisiin erityisen verenkiertojärjestelmän avulla. Selkäydin muodostuu pak-suista hermosykimpuista, jotka kulkevat selkärangan läpi ja ovat hyvin suojattu luukanavan sisälle. Selkäydin on täyttyneenä aivo-selkäydinnesteellä. (Ullman 2009.)

Yleisimmät bakteerilöydökset likvorista ovat *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* sekä *Staphylococcus aureus*. Bakteerit likvorissa voivat aiheuttavaa meningiittiä eli aivokalvontulehdusta tai enkefaliittiä eli aivokuumetta, jotka ovat infektioitauteja, joissa bakteerit ovat tunkeutuneet aivoveriesteren läpi keskushermostoon. Tavallisimmin diagnoosi tehdään likvorinäytteestä tehdyn bakteeriväryksen ja -viljelyn tulosten perusteella. (Heikkilä ym. 2005.) Likvorista tehtävän bakteeriväryksen tutkimuslyhenne on Li-BaktVr, jota käytetään osana keskushermostosairauksien diagnostiikassa. (Tykslab 2017.)

2.3 Askites

Askitesnestettä voi ilmaantua eri sairauksien johdosta, joista suurimpana aiheuttajana (80-85%) on krooninen maksasairaus. Askitesnesteen muodostumisen merkittävimmät syyt ovat natriumin ja veden kertyminen elimistöön sekä kohonnut porttilaskimopaine.

Kirroosissa maksan rakenne muuttuu ja syntyvän fibroosin, eli sidekudoksen arpeutumisen myötä maksassa esiintyvien hiussuonien sekä porttilaskimon paine nousee. Maksan arpeutumisen seurauksena porttilaskimon veri kulkeutuu yhdyssuonia pitkin systeemi-kiertoon ja suodattuu suoraan imunesteeseen. Imusuoniston kapasiteetin ylittyessä kertyy runsasproteiinista nestettä vatsaonteloon. 15-20% askitesnesteen ilmentymisen vuoksi sairaalaan tulleilla todetaan spontaani bakteeriperitoniitti (SBP), jolla tarkoitetaan yleensä gramnegatiivisten bakteerien kulkeutumista systeemiverenkiertoon ja sieltä edelleen askitesnesteseen. (Nordin ja Mäkisalo 2000.)

Diagnostinen askitespunktio tehdään aina ensimmäiseksi askitesnesteen muodostuksessa. Askitesnesteestä määritetään aina veressä oleva proteiini tai albumiini, leukosyytit, tehdään leukosyyteistä erottelu, jossa lasketaan granulotsyytit ja lymfotsyytit, bakteerivärväys ja -viljely sekä sienten natiivitutkimus ja viljely. (Nordin ja Mäkisalo 2000.) Askitesnesteestä tehtävän bakteerivärväyksen tutkimuslyhenne on As-BaktVr, jota käytetään diagnostisesti nopeana bakteerien osoittamisena askitesnesteestä. (Tykslab 2017.)

2.4 Nivelneste

Nivelneste on nivelkalvon erittämä sitkeä, nivelen liikkeitä voiteleva sekä kitkaa vaimentava neste, joka vastaa myös nivelruston ravitsemuksesta. Nivelneste voi olla kirkasta tai verestävää. Nivelontelon tulehtuessa nivelnesteeseen viskositeetti alenee, jolloin leukosyyttien määrä lisääntyy ja proteiinipitoisuus kasvaa. (Ullman 2009.) Artriitilla tarkoitetaan niveltulehdusta, joka voi syntyä hematogeenisesti verenkierron kautta tai paikallisen ihorikon tai toimenpiteen seurauksena. Hematogeenisen artriitin aiheuttaja on tavallisimmin *Staphylococcus aureus*, beetahemolyyttiset streptokokit, *Streptococcus Pneumoniae* sekä gramnegatiiviset sauvat. Nivelnestenäytteestä voidaan tutkia bakteereja bakteeriviljelyllä sekä -värväyksellä. (Heikkilä ym. 2005.)

Nivelnesteestä tutkitaan siinä esiintyvät solut, bakteerit, sekä kiteet kihdin toteamiseksi. Normaalisti nivelnesteestä löytyy valkosoluja alle 200 solua/mm³. Vasta kun soluja on yli 2 000/mm³ viittaa löydös tulehdukseen. Jos soluja on alle 60 000/mm³, on kyseessä useimmiten steriili tulehdus, jolloin ei pystytä toteamaan elävää bakteeria nivelnesteestä. Vasta kun leukosyyttien määrä on yli 60 000/mm³, epäillään bakteerin aiheuttamaa märkäistä tulehdusta eli purulenttia artriittia. Leukosyyteistä yli 90% on granulotsyyttejä.

(Vauhkonen ja Holmström 2012.) Nivelnesteestä tehtävän bakteerivärjäyksen tutkimus-lyhenne on Sy-BaktVr ja sitä käytetään diagnostisesti nopeana bakteerien osoittamisena nivelnesteestä. (Tykslab 2017.)

2.5 Luuydinneste

Luuydinnesteellä tarkoitetaan verta tuottavaa luuydintä. Tämä punainen luuydin tuottaa happea kuljettavia punasoluja, tärkeitä veren hyytymiseen osallistuvia verihiutaleita sekä suuren osan valkosoluista, joiden pääasiallinen tehtävä on taistella infektioita vastaan. Lapsilla on vertatuottavaa luuydintä kaikissa isoissa luissa ja aikuisilla enää litteissä luissa sekä nikamissa. (Siitonen ja Koistinen 2015.)

Luuydinnäyte otetaan tutkittaessa poikkeavien verisoluarvojen syytä tai epäiltäessä veritautia, veritaudin hoidon seurannassa sekä selvittäessä pitkittyneen kuumeen aiheuttajaa. (Salonen 2013.) Luuydinnestettä tutkiessa näyte otetaan aspiroimalla joko rintalastasta (sternum) tai takaharjanteesta (crista iliaca). Tavanomaisesti aspiraationäytettä tutkitaan morfologisesti, mutta sitä voidaan tutkia myös erikoisvärjäyksin sekä virtaussytometrialla, tutkittaessa leukeemisen solun alatyyppejä sekä erilaistumisastetta. Luuytimeen voi päästä bakteereja vain luuydinpunktion yhteydessä, joten näyte otetaan steriilisti välttämällä aiheuttamasta kontaminaatiota. (Vauhkonen ja Holmström 2012.) Luuydinpunktio otetaan usein veritautia sairastavalta, jolloin vastustuskyky on heikempi kuin terveen. Steriili näytteenotto mahdollistaa sen, ettei ihmisen iholla olevat luontaiset bakteerit pääse verenkiertoon aiheuttaen esimerkiksi verenmyrkytystä eli sepsistä. (Lumio 2016.)

3 BAKTEERIT

Bakteerit ovat yksisoluisia esitumallisia eliöitä, prokaryootteja. Niiden tutkimiseen käytetään mikroskooppia, koska paljas silmä pystyy havaitsemaan vain noin 100 mikrometriä halkaisijaltaan olevia partikkeleita. Suurin osa infektioita aiheuttavista bakteereista onkin huomattavasti pienempiä, noin 1-5 mikrometrin kokoisia. Oikealla kasvualustalla bakteerit kasvavat suuremmiksi pesäkkeiksi, jotka voidaan havaita makroskooppisesti. Pesäkkeet saattavat koostua jopa sadoista miljoonista erillisistä bakteerisolusta. (Vaara ym. 2010.)

Bakteerit lisääntyvät jakautumalla, joten niiden kasvuvauhti voi olla eksponentiaalista. Useimmiten bakteerit valitsevat elinympäristökseen ihmisen tai eläimen ja elävät rauhanomaista yhteiselämää, josta on hyötyä sekä bakteerille että isännälle. Eräät bakteerit kuitenkin herättävät ihmisen puolustusmekanismit, jolloin keho alkaa taistella bakteereja vastaan ja syntyy infektioitauteja. (Puhakka ja Salkinoja-Salonen 2002.)

3.1 Bakteerin rakenne

Bakteerit ovat muodoltaan vaatimattomia verrattuna esimerkiksi eläinsoluihin. Bakteerin solu koostuu sitä ympäröivästä soluseinästä, solumembraanista, solulimasta sekä tumal alueesta. (Puhakka ja Salkinoja-Salonen 2002.)

Bakteerit jaotellaan niiden soluseinämän rakenteen mukaan joko grampositiivisiksi tai gramnegatiivisiksi bakteereiksi. Gramnegatiivisilla bakteereilla on soluseinämässä ylimääräinen biologinen kalvo, niin sanottu ulkomembraani, jota grampositiivisilla bakteereilla ei ole. Tämä kalvo suojaa bakteeria tehokkaasti haitallisilta aineilta, mikä tekeekin gramnegatiivisista bakteereista helposti resistenttejä joitain antibiootteja kohtaan. Grampositiiviset bakteerit värjäytyvät sinivioleteiksi ja gramnegatiiviset värjäytyvät punaisiksi. Soluseinäjä määrittelee myös bakteerisolujen muodon, joka voi olla sauvamainen, pallomainen, nauhamainen tai korkkiruuvimainen. (Vaara ym. 2010.)

3.2 Gramvärjäys

Bakteerit ovat pieniä mikrobeja, joita on mahdoton havaita paljain silmin, joten niiden muotoa tutkitaan mikroskoopilla. (Puhakka ja Salkinoja-Salonen 2002.) Bakteerit voidaan havaita mikroskoopilla 40-100-kertaisella objektilla. Tarkan kuvan saamiseksi suurella objektilla tulee käyttää öljyimmersiota. (Bryce & Poelma 2000.) Yksi tärkeimmistä vaiheista bakteerin tunnistuksessa on gramvärjäys, jonka avulla bakteerit erotetaan joko grampositiivisiin tai gramnegatiivisiin bakteeriryhmiin. (Puhakka ja Salkinoja-Salonen 2002.) Tanskalainen Hans Christian Joachim Gram keksi värjäyksen periaatteen vuonna 1883 työskennellessään Berliinissä Karl Friedländerin laboratoriossa. Hän huomasi, ettei kristalliviolettijodiväri huuhtoutunut pois kaikista bakteereista. Saksalainen patologi Carl Weigert keksi joitain vuosia myöhemmin lisätä safraniinivastaväriä, jotta myös väristä huuhtoutuneet solut värjäytyivät helpommin havaittavimmiksi. (Meurman 2010.) Gramvärjäys on nopein esitesti, jolla voidaan identifioida tuntemattomia bakteereita. (Puhakka ja Salkinoja-Salonen 2002.)

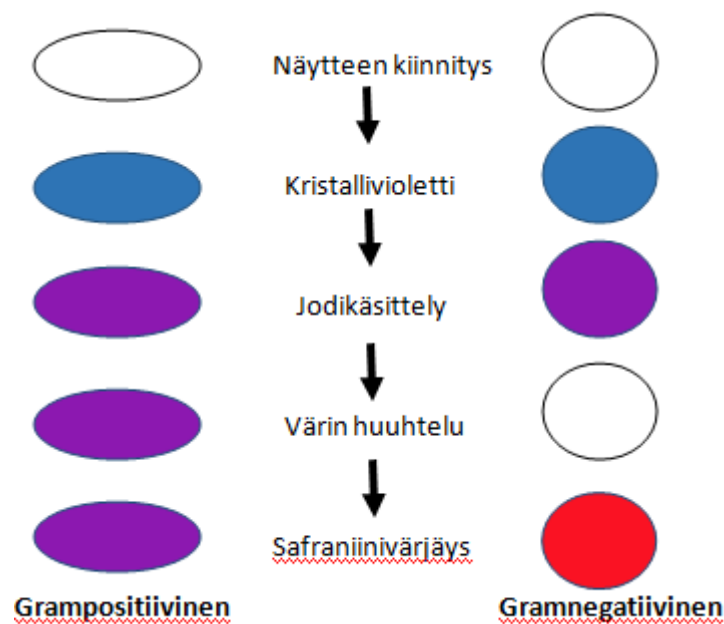
3.2.1 Värjäyksen periaate

Gramvärjäys perustuu grampositiivisten ja gramnegatiivisten solujen erilaisiin soluseinämärakenteisiin. Grampositiivisten solujen peptidoglykaanisoluseinät kutistuvat alkoholi-käsittelyn aikana, jolloin kristalliviolettijodikompleksi ei pääse vuotamaan tiheän polymeriverkoston läpi ulos solusta (Sojakka ja Välimäki 2011). Gramnegatiivisten solujen soluseinät ovat ohuempia kuin grampositiivisten ja niissä on enemmän lipidä kuin peptidoglykaania. Näin ollen soluseinä ei ole yhtä tiivis kuin grampositiivisilla soluilla, koska alkoholikäsittely liuottaa lipidit ja näin ollen päästää kristalliviolettijodikompleksin ulos solusta. Alkoholikäsittelyssä on käytettävä yli 90-prosenttista alkoholia, jotta grampositiiviset solut tiivistyvät, eivätkä päästä siniviolettiä väriä ulos ja näin sekaannu gramnegatiivisten solujen kanssa mikroskopoitaessa. Värjäyksessä grampositiiviset bakteerit värjäytyvät sinivioleteiksi ja gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät punaisiksi. (Puhakka ja Salkinoja-Salonen 2002.)

3.2.2 Värjäyksen suoritus

Punktionesteen gramvärjäystä varten tippa näytettä laitetaan objektilasille, jonka annetaan kuivua huoneenlämmössä tai vaihtoehtoisesti lämpölevyllä. Näytteen pysyminen objektilasilla voidaan varmistaa kiinnittämällä näyte kuumentamalla sitä bunsenliekin alla tai käyttämällä etanolia, asetonia tai kaupallisia kiinnityssuihkeita. Kiinnittäminen eli fiksaaminen säilyttää myös bakteerisolujen rakenteen. (Sojakka ja Välimäki 2011.)

Gramvärjääminen alkaa objektilasin upottamisella kristalliviolettiliuokseen minuutin ajaksi, jonka aikana liuos tunkeutuu nopeasti bakteerin soluseinämän läpi värjäten ne sinivioleteiksi. Tämän jälkeen objektilasi huuhdellaan juoksevan veden alla tai vesiastias-
assa, varoen kuitenkin solujen irtoamista. Seuraavassa vaiheessa objektilasi upotetaan jodiliuokseen minuutin ajaksi, jolloin myös jodi tunkeutuu soluseinämän läpi aiheuttaen värireaktion. Objektilasi huuhdellaan jälleen vedellä, jota seuraa alkoholikäsittely. Objektilasi kastetaan vahvaan alkoholiin (95-99-prosenttista) noin minuutin ajaksi tai kunnes väriä ei enää liukene. Tässä vaiheessa gramnegatiiviset bakteerisolut päästävät kristalliviolettijodiliuoksen ulos soluseinämän läpi, jolloin lasi voi näyttää tyhjältä. Nopean vesihuuhtelun jälkeen objektilasi kastetaan safraniiniliuokseen, joka värjää gramnegatiiviset bakteerisolot punaisiksi. Objektilasin annetaan kuivua rauhassa, jonka jälkeen se on valmis mikroskoipoitavaksi. (Sojakka ja Välimäki 2011.) Kuvassa 1 on esitetty gramvärjäyksen vaiheet.



Kuva 1. Gramvärjäyksen vaiheet. (Muokattu Solunetti 2006.)

3.2.3 Värjäyksen virhelähteet

Gramvärjäykseen liittyy monia virhelähteitä, joiden vuoksi bakteerit voivat värjäytyä epänormaalisti. Värjäytyvyydessä yleisempää on että, grampositiiviset värjäytyvät virheellisesti gramnegatiivisiksi. Potilaan antibioottikuuri esimerkiksi vaurioittaa bakteereita, jolloin grampositiiviset bakteerit voivat värjäytyä virheellisesti gramnegatiivisiksi. Osa virhelähteistä johtuu epähuolellisesta laboratoriotyöskentelystä ja huonosta tekniikasta siveelyvalmisteen teossa. Grampositiivisen bakteerin värjäytyminen virheellisesti gramnegatiiviseksi voi johtua esimerkiksi liian ohueksi sivelystä valmisteesta, näytettä on hangattu lasille, jolloin bakteerit ovat vaurioituneet, liiasta kuumennuksesta kiinnityksessä, liian pitkistä vesipesuista, vanhentuneesta jodiliuoksesta tai vedestä värinpoistoliuoksessa. (Meurman 2010.) Brian Harrington ja Mary Plenzler (2015) korostavat artikkelissaan gramvärjäyksen oikean suoritustavan merkityksestä. Artikkelin tapauksessa lasilla nähtiin grampositiivisten kokkien lisäksi myös gramnegatiivisia kokkeja. Epäiltäväksi jäi oliko potilaalla grampositiivia kokkeja, joiden seinämä oli hajonnut ja näin muutamia bakteeri värjäytynyt virheellisesti punaisiksi vai oliko potilaalla kahden populaation bakteereja. Vastaavasti gramnegatiivisen bakteerin värjäytyminen grampositiiviseksi voi johtua liian paksusta valmisteesta, liian kuivasta lasista ennen värinpoistoa, kristallivioletin tai jodin pääsystä värinpoistoliuokseen (Meurman 2010).

4 OPPIMATERIAALI

Oppiminen on prosessi, jonka aikana oppija aktiivisesti vastaanottaa ja muokkaa uutta tietoa. Prosessin aikana syntyy uutta tietoa sekä ymmärrystä. Ihminen pystyy lähes rajattomasti oppimaan uusia asioita sekä palauttamaan mieleensä vanhoja tietoja ja taitoja. Visuaalinen havainto ja hyvin jäsennelty teksti tukee oppijan muistia uuden asian oppimisessa tai vanhan virkistämisessä. (Hiltunen 2005.) Laadukas oppimateriaali on tiettyä koulutustarvetta varten toteutettu kokonaisuus. Laadukas oppimateriaali on oppimista tukeva, jäsennelty kokonaisuus ja luotettavaan tietoon perustuva tuotos. (Suomen tietokirjailijat ry 2017.)

Sähköisellä oppimateriaalilla tarkoitetaan tietoverkkojakelussa olevaa kokonaisuutta, joka koostuu opetus- ja opiskelukäyttöön tuotetusta sisällöstä sekä siihen liittyvistä metatiedoista ja ohjeista. Sähköisen oppimateriaalin laatuun vaikuttavat samat tekijät kuin muunkin oppimateriaalin laatuun, joita ovat esimerkiksi sisällön tarkoituksenmukainen rajausta, kohderyhmän tuntemus, sisällöntuottajien asiantuntemus, didaktinen lähestymistapa, oppimiskäsitys sekä viestinnän ja ilmaisun hallinta. Sähköisen oppimateriaalin hyötyinä on sen helppo saatavuus, etänä oppimisen mahdollistaminen paikasta riippumatta ja tietojen päivitys. (Högman 2006.)

Powerpoint- muotoisen oppimateriaalin suunnittelu alkaa sisällön rakentamisesta. Sisällön tulee vastata tarkoitettua oppimisen päämäärää. Powerpoint-esityksen tarkoitus on toimia oppimisen välineenä oppijan oppimisen tukena. Oppiaineen sisällön tulee olla kattava, riittävän laaja, ajanmukainen ja virheetön. Sisällön rakenteen tulee olla looginen, hyvin jäsennelty ja jaksotettu, korostaen ydinoppia sekä integroitu kokonaisuus. Powerpoint-oppimateriaalin tehtävä on olla selkeä, ymmärrettävä ja havainnollistava esitys, joka motivoi oppijaa. (Högman 2006.)

5 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITE

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on valmistaa sähköinen oppimateriaali punktionesteiden bakteerilöydöksistä. Oppimateriaali on Powerpoint –muodossa toteutettu tuotos, jossa kuvaillaan mitä elimistön punktionesteet ovat ja mistä ne koostuvat. Oppimateriaalissa kerrotaan myös punktionesteiden värjäysmenetelmästä, jonka avulla voidaan havaita mahdolliset bakteerilöydökset ja erotella gramnegatiiviset ja grampositiiviset bakteerit toisistaan.

Tämän opinnäytetyön tavoite on olla apuna Turun ammattikorkeakoulun bioanalyttikokoulutuksen mikrobiologian opintojakson opetuksessa ja tukea oppilaita bakteerien tunnistamisessa. Valmiita kuvia bakteereista on helppo verrata mikroskoopin näkymään.

6 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

6.1 Opinnäytetyön toteutus

Toimeksianto opinnäytetyöhön saatiin Turun ammattikorkeakoululta helmikuussa 2017. Aihe on lähtöisin Turun yliopistollisen keskussairaalan päivystys- ja automaatiolaboratoriosta, joka on pyytänyt täydennyskoulutusta punktionesteiden bakteerilöydöksistä. Toimeksiantosopimus tehtiin Turun ammattikorkeakoulun kanssa toukokuussa 2017. Päivystyslaboratorio valmisti ylimääräiset objektilasit bakteereja sisältävistä potilasnäytteistä kevään 2017 aikana. Nämä lasit kuvattiin sähköiseen oppimateriaaliin Turun ammattikorkeakoulun tiloissa kesäkuussa 2017, ja alkuperäiset lasit jäivät opetuskäyttöön Turun ammattikorkeakoululle bioanalytiikan koulutusta varten.

Kirjallista aineistoa opinnäytetyötä varten kerättiin kesällä 2017. Kesän aikana kirjoitettiin myös opinnäytetyön teoreettinen osuus. Powerpoint –muotoinen oppimateriaali koottiin syksyllä 2017 opinnäytetyön pohjalta. Oppimateriaalin alkuun koottiin tiivistetysti eri punktionesteet, mistä ne muodostuvat, niiden tehtävät sekä yleisimmät bakteerilöydökset. Punktionesteiden jälkeen kerrottiin bakteereista ja niiden ominaisuuksista. Seuraavaksi oppimateriaali käsittelee gramvärjäystä ja sen periaatetta sisältäen ohjeen gramvärjäyksen suorittamiseen. Oppimateriaali käsittelee myös gramvärjäyksen virhelähteitä. Bakteerien tunnistamiseksi oppimateriaalin loppuun lisättiin mikroskoopin avulla otettuja kuvia saaduista punktionestelaseista. Kuvat sisältävät grampositiivisia kokkeja ja sauvoja, gramnegatiivisia kokkeja ja sauvoja sekä muutaman negatiivisen näytteen. Oppimateriaalista tuotettiin laadukas, selkeä ja helppolukuinen kokonaisuus Turun ammattikorkeakoulun käyttöön.

6.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Toiminnallinen opinnäytetyö on yksi ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden muodoista. Sen tavoite on ammatillisen toiminnan opastaminen, ohjeistaminen tai järjestäminen. Toiminnallinen opinnäytetyö voi olla esimerkiksi käytännön ohje, ohjeistus tai tapahtuma. Toteutustapana voi olla kirja, vihko, opas, oppimateriaali, blogi, verkkosivusto, näyttely

tai tapahtuma. Toiminnallinen opinnäytetyö koostuu yleensä kahdesta osasta, joista ensimmäinen osa on toiminnallinen osuus eli itse tuotos ja toinen on työn raportointi. (Vilkkä & Airaksinen 2003.)

Tämä opinnäytetyö on toiminnallinen, koska sen tuotoksena syntyi powerpoint -muotoinen oppimateriaali, jonka raporttina tämä opinnäytetyö toimii. Oppimateriaali tuli Turun ammattikorkeakoulun käyttöön ammatillisen toiminnan opastamisen tueksi. Turun yliopistollisen keskussairaalan päivystys- ja automaatiolaboratorio oli pyytänyt täydennyskoulutusta punktionesteiden bakteerilöydösten tunnistamisesta Turun ammattikorkeakoululta, minkä seurauksena syntyi aihe kuvallisen oppimateriaalin tekemisestä.

6.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Hyvä tieteellinen käytäntö tarkoittaa, että tutkimus on eettisesti hyväksyttävää ja luotettavaa. Tieteellisen tutkimuksen tulokset ovat uskottavia vain, jos tutkimus on toteutettu hyvän tieteellisen käytännön edellytyksin. Tutkimuksessa tulee noudattaa rehellisyyttä, huolellisuutta sekä tarkkuutta tuloksien esittämisessä ja arvioinnissa. Tutkimusta aloittaessa tarvitsee hankkia tarvittavat tutkimusluvut. Tutkimuksessa noudatetaan hyvää henkilöstö- ja taloushallintoa sekä huomioidaan tietosuojaa koskevat ongelmat. Tutkimustyössä tulee antaa arvoa muiden tutkijoiden saavutuksille viitatessaan heidän julkaisuihinsa asianmukaisella tavalla ja plagioimatta heidän kirjoitelmiaan. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012-2014.)

Opinnäytetyötä varten tehtiin toimeksiantosopimus Turun ammattikorkeakoulun kanssa. Asianosaisille ilmoitettiin mahdolliset merkitykselliset sidonnaisuudet. Työ on tärkeä ja merkityksellinen, sillä oppimateriaalista on hyötyä bioanalyttikko-opiskelijoille. Havaintomateriaalina käytetyistä punktiolaseista ei käy ilmi näytteen alkuperä, näin ollen potilaan tietosuoja säilyy. Lasit jäävät Turun ammattikorkeakoulun opetusmateriaaliksi, joten koulu vastaa lasien säilytyksestä.

7 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli valmistaa helppolukuinen oppimateriaali punktioneusteiden bakteerilöydöksistä. Oppimateriaalin tueksi saatiin valmiiksi värjättyjä punktioneustelaseja Turun yliopistollisen keskussairaalan päivystys ja automaatiolaboratoriosta. Bakteereja sisältäviä laseja kertyi neljätoista kappaletta, joista 4 sisälsi grampositiivisia kokkeja, 3 gramnegatiivisia sauvoja, 2 gramnegatiivisia kokkeja ja 1 grampositiivisia sauvoja. Näiden lisäksi kaksi lasia sisälsi kahta eri bakteerilajia ja kahdessa lasissa ei ollut bakteerilöydöksiä ollenkaan. Näistä näyttemateriaaleista saatiin koottua kuvalliset esimerkit miltä bakteerit näyttävät oikeissa potilasnäytteissä. Turun Ammattikorkeakoulun hematologian luokassa kuvatuista laseista saatiin selkeät kuvat, joista bakteerin muodon ja värin erottaa helposti. Vähäinen lasien määrä aiheutti hankaluuksia joidenkin bakteerien havainnollistamisessa. Suuremmalla lasien määrällä oppimateriaalista olisi saatu kattavampi.

Jotta oppimateriaalista tulisi selkeä ja helppolukuinen, se koottiin johdonmukaiseen järjestykseen käyttäen vain oleellisinta tietoa kerätystä aineistosta. Oppimateriaali aloitettiin kertomalla punktioneusteistä, mitä ne sisältävät, niiden tehtävistä ja yleisimmistä bakteerilöydöksistä. Aiheen rajaamiseksi oppimateriaalissa ei syvennytty bakteerin rakentamiseen tarkemmin, vaan kerrottiin yleisesti niiden ominaisuuksista, käyttäytymisestä ja merkityksestä ihmiselle. Tämän jälkeen kerrottiin gramvärjäyksen periaatteesta, suoritustavasta ja mahdollisista virhelähteistä. Oppimateriaalin lopussa on mikroskoopilla otettuja kuvia bakteereista havainnollistamaan niiden tunnistamista. Kuvissa näkyy bakteerien lisäksi myös muitakin soluja ja artefaktoja, joten kuviin lisättiin nuolet, jotta bakteereiden havaitseminen kuvista helpottuisi. Oppimateriaalista tuli tiivis ja informatiivinen tietopaketti huomioiden oppimateriaalin tarkoituksen ja kohderyhmän.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli olla apuna Turun ammattikorkeakoulun bioanalyttikko-opiskelijoiden mikrobiologian opetuksessa. Bioanalyttikkokoulutukseen ei sisälly omaa kurssia punktioneusteistä, vaan niitä käsitellään pintapuolisesti eri kursseilla. Punktioneusteistä on myös vähäisesti saatavilla tietokirjallisuutta. Koulutukseen sisältyy 5 opintopisteen suuruinen opintokokonaisuus kliinisestä mikrobiologiasta, joka käsittelee taudinaiheuttajamikrobeja. Bakteerit käsitellään kattavasti kurssin aikana, mutta niiden tunnistaminen mikroskoopilta jää vähäiseksi. Tämän vuoksi oppimateriaali tehtiin tukemaan

opiskelijaa bakteerien tunnistamisessa myös myöhemmässä vaiheessa opintoja. Powerpoint –muotoinen materiaali on aina helposti saatavilla.

Ennen opinnäytetyön aloittamista teimme toimeksiantosopimuksen Turun ammattikorkeakoulun kanssa. Opinnäytetyö on eettisesti hyväksyttävä, sillä siinä käytetty tieto on kerätty luotettavista lähteistä ja asianmukaisesti viitaten. Oppimateriaalia varten kuvatut, valmiiksi värjätyt punktionestelasit saatiin anonymoineina, eli niistä ei käy ilmi näytteen alkuperä ja tällöin potilaan tietosuoja säilyi. Lasit jäivät Turun ammattikorkeakoulun opetusmateriaaliksi, joten koulu vastaa niiden säilytyksestä ja aikanaan niiden hävityksestä.

Tämän opinnäytetyön jatkotutkimuksen aiheena voisi olla laajempi oppimateriaali bakteereista ja niiden lajikohtaisesta esiintymisestä. Oppimateriaalissa voitaisiin kertoa esimerkiksi mille bakteereille on tyypillistä esiintyä diplokokkeina, pitkinä ketjuina tai yksilöinä.

LÄHTEET

Aalto, J. 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus

Alahuhta, S.; Ala-Kokko, T.; Kiviluoma, K.; Perttilä, J.; Ruokonen, E. ja Silfvast, T. 2016. Peruselintoimintojen häiriöt ja niiden hoito. Helsinki: Kustannus oy Duodecim

Bryce, J. & Poelma, P. 2000. Bacteriological Analytical Manual. U.S Department of Health and Human Services. Viitattu 14.11.2017 <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063344.htm>

Harrington, B. & Plenzler, M. 2015. Misleading Gram Stain Findings on a Smear from a Cerebrospinal Fluid Specimen. Viitattu 20.4.2017 <https://academic.oup.com/labmed/article-lookup/doi/10.1309/1UEFXNMVVKR39PNB>

Heikkilä, R.; Hellsten, S.; Koukila-Kähkönen, P.; Kurkinen, T.; Meurman, O.; Nummelin, R.; Pastila, S.; Richardson, M. ja Ylönen, H. 2005. Kliininen mikrobiologia terveydenhuollossa. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy

Hiltunen, E.; Holmberg, P.; Kaikkonen, M.; Lindblom-Yläne, S.; Nienstedt, W. & Wähälä, K. 2005. Galenos: Ihmiselimistö kohtaa ympäristön. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö

Högman, E. 2006. Verkko-oppimateriaalin laatukriteerit. Helsinki: Edita Prima Oy Viitattu 31.10.2017 http://www.oph.fi/download/47132_verkko-oppimateriaalin_laatukriteerit.pdf

Kinnula, V.; Brander, P. & Tukiainen P. 2005. Keuhkosairaudet. Helsinki: Duodecim

Lumio Jukka. 2016. Sairaalainfektiot ja sairaalabakteerit. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 12.8.2017. https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01042

Meurman O. 2010. Gramvärjäykset. Moodi. Helsinki: Labquality

Mundt, L. & Shanahan, K. 2011. Graff's Textbook of Urinalysis and Body Fluids. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business: Philadelphia

Nordin, A. & Mäkisalo, H. Askites- Kuoleman merkki?. 2000. HYKS:n kirurgian klinikka, tranplantaatio- ja maksakirurgia: Duodecim. Viitattu 17.7.2017 <http://www.ebm-guidelines.com/xmedia/duo/duo91781.pdf>

Puhakka, J. & Salkinoja-Salonen, M. 2002. Mikrobisolujen rakenne. Teoksessa Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerrus

Risteli J. 2010. Nivelnestetutkimukset. Moodi. Helsinki: Labquality

Salomaa, E. 2016. Keuhkopussin nestekertymä (keuhkopussin tulehdus, pleuriitti). Kustannus oy duodecim Viitattu 17.7.2017 http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00030

Salonen, J. 2013. Artikkelissa: Luuydinnäyte. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 12.8.2017. https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk01142

- Siitonen, T. & Koistinen, P. 2015. Veritaudit. Helsinki: Duodecim
- Sojakka, K. & Välimäki, M. 2011. Ammatillinen mikrobiologia. Tampere : Juvenes Print
- Solunetti. 2006. Gram-värjäys. Viitattu 31.10.2017. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/gram-varjays/2/>
- Suomen tietokirjailijat ry. Laadukas oppimateriaali turvaa oppimisen. Viitattu 12.4.2017 <https://www.suomentietokirjailijat.fi/>
- Tuokko, S.; Rautajoki A. & Lehto L. 2008. Kliiniset laboratorionäytteet –opas näytteenottoa varten. Helsinki: Tammi
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Hyvä tieteellinen käytäntö (HKT) –ohje. Viitattu 11.4.2017 <http://www.tenk.fi/fi/hyva-tieteellinen-kaytanto>
- Tykslab 2017. Tutkimusohjekirja. Pf-Bakteeri, värjäys. Viitattu 12.8.2017. <https://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=786>
- Tykslab. 2017. Tutkimusohjekirja. As-Bakteeri, värjäys. Viitattu 12.8.2017. <https://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=774>
- Tykslab. 2017. Tutkimusohjekirja. Li-Bakteeri, värjäys. Viitattu 12.8.2017. <https://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=1157>
- Tykslab. 2017. Tutkimusohjekirja. Sy-Bakteeri, värjäys. Viitattu 12.8.2017. <https://webohjekirja.mylabservices.fi/TYKS/index.php?test=766>
- Ullman, H. F. 2009. Opas anatomiaan. Alkuperäisteos: Atlas der Anatomie. Munchen: Elsevier GmbH. Suomenkielinen painos: Tandem Verlag GmbH h.f.ullmann is an imprint of Tandem Verlag GmbH
- Vaara, M.; Skurnik, M. & Sarvas, M.2010. Bakteerisolun rakenne ja toiminta. Sarjassa mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Teoksessa Mikrobiologia. Jyväskylä: WS Bookwell Oy
- Vauhkonen, I. & Holmström, P. 2012. Sisätaudit. Helsinki: Sanoma Pro Oy